

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-265999

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)11月18日

C 12 Q 1/68

C 12 N 15/00

G 01 N 33/50

A-8412-4B

7115-4B

P-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全29頁)

⑮ 発明の名称 核酸含有試料中の微生物の検出

⑯ 特 願 昭62-51169

⑰ 出 願 昭62(1987)3月5日

優先権主張 ⑱ 1986年3月5日 ⑲ 米国(US) ⑳ 836378

㉑ 1986年12月29日 ㉒ 米国(US) ㉓ 943006

⑳ 発 明 者 ナニブフシヤン・ダツ アメリカ合衆国コネチカット州06511ニューヘブン・プロ
タグプタ スペクトストリート 470㉑ 発 明 者 ビーター・エム・エ アメリカ合衆国コネチカット州06517ハムデン・イングラ
ム・レイ ムストリート 71㉒ 出 願 人 モレキユラー・ダイア アメリカ合衆国コネチカット州06516ウエストヘブン・モ
グノステイツクス・イ ーガンレイン 400
ンコーポレーテッド

㉓ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉

明 細 書

1、発明の名称

核酸含有試料中の微生物の検出

2、特許請求の範囲

1、工程：

a) 核酸含有試験試料を調製し、この調製は試験試料中の核酸を標識することを含み、

b) オリゴヌクレオチドまたは1種または2種以上の既知の微生物の一本鎖核酸または真核生物源からの配列一本鎖核酸を固定化することによって、1または2以上のプローブを調製し、

c) 交雑条件下に、標識した一本鎖の試料の核酸および固定化したオリゴヌクレオチドまたは一本鎖の核酸を接触させて、交雑した標識核酸を形成し、そして

d) 標識を検出することによって、交雑した核酸についてアッセイする、
を含んでなることを特徴とする核酸含有試験試料中の1種または2種以上の微生物または真核生物

源からのポリヌクレオチド配列を検出する方法。

2、標識した核酸を変性して標識した一本鎖核酸を形成する工程をさらに含む特許請求の範囲第1項記載の方法。

3、前記真核生物源は、藻類、原生動物、粘菌および哺乳動物の遺伝的疾患、例えば、アルファ-サラセミアおよび鎌状赤血球貧血から成る群より選択される特許請求の範囲第1または2項記載の方法。

4、標識は生きている全細胞または細胞のリゼイトの中で実施する特許請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の方法。

5、細胞のリゼイトは細胞をアルカリと接触することによって調製する特許請求の範囲第4項記載の方法。

6、標識は、蛋白質結合性配位子、ハプテン、抗原、蛍光化合物、色素、放射性同位元素および酵素から成る群より選択される特許請求の範囲第

1～5項のいずれかに記載の方法。

7、固定化は化学的反応または物理的吸着によって実施する特許請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の方法。

8、プローブは固体の支持体のストリップ上のドットの形態で固定化された2種またはそれより多い既知の微生物または真核生物源からの配列である特許請求の範囲第1～7項のいずれかに記載の方法。

9、前記標識は核酸結合性配位子を試験試料中の核酸と光化学的に反応させることによって実施する特許請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の方法。

10、1または2以上の容器内に、

a) 1種または2種以上の微生物または真核生物源からのポリヌクレオチド配列をその上に固定化して含有する固体の支持体、

b) 試験試料の核酸を標識するための試薬、

c) 試験試料中の核酸を変性するための試薬、

願第PCT/US83/01029号に開示された。

交雑後に核酸、例えば、DNAを検出するための最も効率よくかつ感度のある方法は、放射線標識したDNAを必要とする。オートラジオグラフィおよび酵素の使用は、アッセイの時間を延長させ、そして経験を要する技術を必要とする。

ファルコウ (Falkow) らへの米国特許第4,358,535号は、特性病原性生成物の暗号を指定する核酸に対して相補的な標識ヌクレオチドプローブを使用する伝染病の診断を記載している。

B、特異的真核生物の配列の検出

真核生物の核酸試料中の特異的配列の変更の同定は、試料からのDNAを固定化し、そしてそれを標識したオリゴヌクレオチドと交雑させ、そして固定化DNAと標識検体との間で交雑が起こったかどうかを観察することによって、実施するこ

および

e) 交雑試薬、

を含んでなることを特徴とする試験試料中の1種または2種以上の微生物または真核生物源からのポリヌクレオチド配列を検出するためのキット。

3、発明の詳細な説明

本発明は、微生物の検出および同定、および核酸含有試験試料中の特定の原核または真核生物のDNA源の検出および同定に関する。

なおさらに、本発明は全細胞の溶解 (lysis) の方法に関する。

A、微生物の検出

微生物の混合物を含有する試料中の微生物の種の同定を、試料からのDNAを固定化し、そしてそれを標識した検体の種—既知の微生物からの特異的DNAと交雑させ、そして固定化DNAと標識検体との間で交雑が起こったかどうかを観察することによって、実施することは、PCT特許出

とは、現在係属中の1986年12月23日提出の欧州特許出願第86 117 978号に記載されている。

特異的遺伝子の発現は人間の生理学的状態を決定することが知られている。例えば、第6アミノ酸位置におけるGAG~GTGのベータグロブリン遺伝子の解読配列の変化は、鎌型—ベータグロブリンを生成し、溶液ホモジネートは鎌型赤血球貧血として知られている病気を有することがある。同様に、アルファグロブリンまたはベータグロブリンの遺伝子からの特定の配列の欠失はサラセミアを起こすことがある。最近の概観、新しい遺伝学および臨床的实际 (The New

Genetics and Clinical Practice)、D. J. ウェサラル (Weatherall)、ザ・ナフィールド・プロヴィンシアル・ホスピタル・トラスト (The Nuffield Provincial Hospital Trust)、(1982)、2章

は、遺伝病の頻度および臨床的スペクトルを記載している。

遺伝的疾患に関連する問題は、核酸配列の情報によって診断することができる。このような配列の情報を検出する最も容易な方法は、既知の配列の特異的プローブと交雑させる方法を使用することである。

ウィルソン (Wilson) らへの米国特許第 4,395,486 号は、制限エンドヌクレアーゼアッセイを用いて鎌型赤血球貧血を P 接分析する方法を記載している。

エドワード (Edward) M. ルビン (Rubin) およびエット・ワイ・カン (Yuet Wai Kan)、「 α -サラセミアにより引き起こされるハイドロプス・フェタリスについての簡単な感受性胎児の試験 (A Simple Sensitive Prenatal Test for Hydrops Fetalis Caused By α -Thalassaemi

の場合における検出はオートラジオグラフィよりも速いが、ニック翻訳法は高度に熟練した人員を必要とする。その上、ビオチニル化 UTP (ウリジントリホスフェート) を使用するビオチニル化は、チミジン含有ポリヌクレオチドについてのみに有効である。他のヌクレオシドトリホスフェートの使用は、ビオチンを使用する A (アデニン) または G (グアニン) または C (シトシン) ($-NH_2$ を含有する) の化学的誘導体化は、訓練した有機化学者を技能を必要とする。

C. 細胞の溶解

本発明は、また、全細胞の DNA を開放し、そして光化学的に利用できるようにする、全細胞を効率よく溶解する方法を提供する。多細胞の動物から誘導される真核生物の細胞は比較的穏和な条件下に容易に溶解されるが、単細胞の真核生物および原核生物、ことにグラム陽性原核生物は、化学的性質が複雑でありかつそれらの細胞壁の架構の程度のために、溶解がより困難である。化学的

a)」、ザ・ランセット (The Lancet)」、1985年1月12日、75-77ページは、ホモ接合体 α -サラセミアの遺伝子型とヘモグロビン-H病および α -サラセミアの特性の遺伝子型とを区別するためのドット・プロット分析を記載している。

交雑後に核酸、例えば、DNAを検出するための最も効率よくかつ感度のある方法は、放射線標識したDNAを必要とする。オートラジオグラフィおよび酵素の使用は、アッセイの時間を延長させ、そして経験を要する技術を必要とする。

最近、DNAを標識する非放射線的方法は、ワード (Ward) ら、欧州特許出願第 63,879 号に記載された。ワード (Ward) らは、ニック翻訳を使用して、ビオチニル化 U (ウラシル) 残基を DNA 中に導入し、T (チミジン) を置換している。次いで、ビオチン残基を抗ビオチン抗体またはアビジン含有系でアッセイする。こ

酵素的または物理的な手段によって、これらの耐性の有機体を効率よく溶解する方法は実際に存在するが、これらの方法はしばしば複雑であり、時間を消費し、そして DNA の一耐性を保存するためには不効切である。

したがって、本発明の目的は核酸含有試料中の微生物を検出する方法を提供することである。

本発明の他の目的は、1 より多い核酸配列の存在について同時にアッセイする方法を提供することである。

他の目的は、特定の原核生物または真核生物の DNA 配列を同定する方法および個々の遺伝子のアレルを区別する方法を提供することである。

本発明の他の目的は、未知の試験試料を標識する簡単な光化学的方法を提供することである。

本発明のほかの目的は、プローブを固定化した未知の標識しない試験試料とプローブを交雑させるとき、交雑および洗浄後残留する標識の型が未知の試料中に存在する核酸配列の型を決定するよ

うに、異なる種類の標識でプローブを標識することである。

本発明のなお多の目的は、プローブおよび／または試験試料として全染色体核酸を使用することである。

また、本発明は固定化されたプローブとしてオリゴヌクレオチドを使用することに関する。

これらの目的および他の目的および利点は、本発明に従い、核酸含有試験試料中の核酸配列を検出する方法について実現される。

この方法は、工程：

a) 試験試料を準備し、この準備は試験試料中の有機体または細胞または細胞破片の核酸をを標識することを含み、

b) 1種または2種以上の既知の微生物または真核生物源、または特定の遺伝子またはそれらのアレル (allele) を表わす配列を固定化することによって、1または2以上のプローブを調製し、

列を有することを示すであろう。

いくつかの微生物学的系または1種または2種以上遺伝子の異なるアレルのための核酸プローブは、固体の支持体、例えば、ニトロセルロース紙上の別々に固定化することができる。試験試料の核酸は標識され、そして溶液中に残留する。固定化されたプローブを含有する固体の物質を、交雑条件下に、標識された試験核酸溶液と接触させる。固体の物質を洗浄して交雑しない核酸を除去し、そして標識をアッセイする。1種または2種以上のプローブもつ標識の存在は、試験試料がそれらのプローブに対して実質的に相補的な核酸を含有し、それゆえ、例えば、特定の微生物学的系による感染から由来することを示す。

標識付けは生きている全細胞または細胞リゼイト (lysate) 中で達成することができ、そして非アイソトープ的であることができる。

本発明は、また、グラム陽性バクテリアおよびグラム陰性バクテリアの両者から核酸を開放させ

c) 交雑条件下に、標識した一本鎖の試料の核酸および固定化したオリゴヌクレオチドまたは一本鎖 (プローブ) の核酸または固定化したオリゴヌクレオチドを接触させて、交雑した標識核酸を形成し、そして

d) 標識を検出することによって、交雑した核酸についてアッセイする、
を含んでなることを特徴とする。

この方法は、さらに、工程 (a) からの標識された核酸を変性 (denature) して標識され変性された核酸を形成することをさらに含む。

本発明によれば、標識された核酸の試験試料をいくつかの異なる型のDNAプローブと交雑のために同時に接触させる。核酸の試験試料を標識し、そしていくつかの標識されない固定化プローブと交雑させる。プローブの位置を固定し、そして交雑後検出される標識されたプローブは、試験試料が対応するプローブに対して相補的な核酸配

る特別の溶解条件に関する。

本発明は、さらに、

a) 1種または2種以上の既知の微生物または真核生物源の一本鎖DNAをその上に固定化して含有する固体の支持体、例えば、既知の微生物または真核生物のドットまたはスポットを含有するストリップ、

b) 試験試料の核酸を標識するための試薬、

c) 試験試料中の核酸を変性するための試薬、
および

e) 交雑試薬、

を含んでなることを特徴とする試験試料中の微生物または真核生物を検出するためのキットに関する。

交雑した核酸の化学発光の検出のために、キットは化学発光検出のための試薬をさらに含む。

上に記載したキットにおいて、標識付けのために試薬は標識についての説明するとき下に記載する。

DNAを開放しかつ変性するための試薬は、水酸化ナトリウムおよび溶解剤、例えば、洗浄剤およびリゾチームを包含する。

典型的な交雑試薬は、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、ウシ血清アルブミン、脱脂乳または硫酸デキストランおよび必要に応じてホルムアミドの混合物を含む。

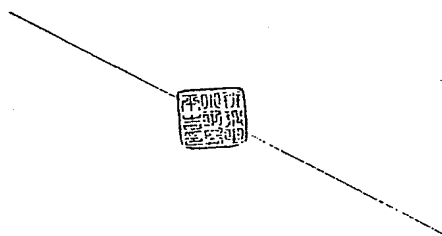
核酸は、好ましくは、光化学的に、光反応性フロクマリンまたはフェナトリジン化合物を使用して核酸を標識に結合することによって標識され、そして標識は普通の方法で、例えば、蛍光検出により「読む」かあるいはアッセイすることができる。

こうして、最終生成物は、(a) 核酸成分、(b) 核酸成分に光化学的結合したインターカレイター (intercalator) または他のDNA結合性配位子、および(c) (b) に化学的に結合した標識からなる、標識された核酸ブ

ローブである。

この光化学的方法は、生化学的に感受性の物質のための通常の化学的結合法よりも、好適な反応条件を提供する。インターカレイターおよび標識を、まず、結合し、次いで核酸と光化学的に反応させるか、あるいは核酸を、まず、インターカレイターと光化学的に反応させ、次いで標識に結合することができる。

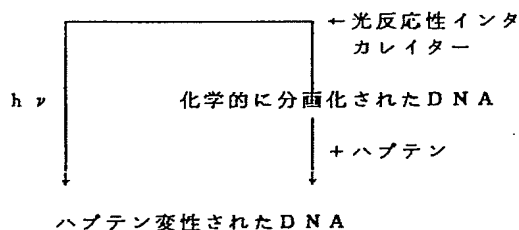
核酸、例えば、二本鎖DNAを標識または反応性部位、例えば、ハプテンに結合する一般的方法は次の通りである：



標識
+
光反応性
インターカレイター

ハプテン変性された
光反応性
インターカレイター

↓ 二本鎖DNA



核酸の交雑可能な部分が二本鎖の形態である場合、次いでこのような部分を変性して交雑可能な一本鎖部分を生成する。あるいは、標識されたDNAが一本鎖形態ですでに存在する交雑可能な部分からなるとき、このような変性を必要に応じて回避することができる。あるいは、検出すべき配列の存在下にのみ二本鎖DNAを発生する交雑フォーマットを使用して交雑が起こった後、前記DNAを本発明のアプローチによって標識することができる。

特異的な効率よい光化学的生成物を生成するために、核酸成分および光反応性インターカレイター化合物を特別な方法で暗所で反応させることが望ましい。

DNAへの結合のため、アミノメチルプソラレン、アミノメチルアングリシンおよびアミノアルキルエチジウムまたはメチジウムアジド類はとくに有用な化合物である。それらは二本鎖DNAへ結合し、そして複合体のみが光付加物を生産す

る。標識した二本鎖DNAを変性して交雑可能な一本鎖区域を生成しなくてはならない場合、DNAの2本の鎖と単一の光付加物との同時の相互作用を防止するような条件を用いる。プローブまたは試料の交雑可能な一本鎖部分に沿った変性の頻度は交雑に交雑を妨害するほど大きくないことが必要であり、それゆえ25、より通常50、好ましくは100ヌクレオチド塩基につき1以下の変性部位が存在することが好ましい。アンゲリシン誘導体はモノ付加物の形成のためにはブソラレン化合物よりもすぐれる。一本鎖DNAをある余分の二本鎖DNAに共有的に取り付ける場合、フェナントリジウム化合物およびブソラレン化合物は暗所で二本鎖DNAと特異的に相互作用するので、これらの化合物を使用することが望ましい。標識のためDNAを変更するための結合した試薬を合成する化学は、すべての場合について類似し、後に詳述する。

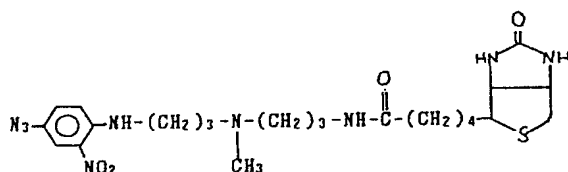
DNA化合物は一本鎖または二本鎖のDNAま

このような挿入剤 (intercalating agents) のとくに有用な光反応性の形態はアジドインターカレイターである。それらの反応性ニトレン類は長い波長の紫外線または可視光線で容易に発生し、そしてアリールアジド類のニトレン類はそれらの転位生成物よりも挿入反応を好む [ホワイト (White) ら, メソーズ・イン・エンジモロジー (Methods in Enzymology), **64**, 644 (1977) 参照]。代表的なアジドインターカレイターは3-アジドアクリジン、9-アジドアクリジン、エチジウムモノアジド、エチジウムジアジド、エチジウム二量体アジド [ミッチェル (Mitchell) ら, JACS, **104**, 4265 (1982)]、4-アジド-7-クロキノリンおよび2-アジドフルオレンである。特異的核酸結合性アジド化合物はフォースター (Forster) ら, 核酸の研究 (Nucl. Acids Res.), **13**, (1985), 745に記載

たはRNAまたはそれらの断片、例えば、制限酵素により生産されるものあるいは比較的短いオリゴマーであることだえできる。

核酸成分を標識へ結合するために使用する本発明のDNA結合性配位子は、既知のDNA結合性配位子の任意の適当な光反応性形態であることができる。とくに好ましいDNA結合性配位子は、次の通りである：インターカレイター化合物、例えば、フロクマリン類、例えば、アンゲリシン (イソブソラレン) またはブソラレンまたはDNAと光化学的に反応するそれらの誘導体、例えば、4'-アミノメチル-4, 5'-ジメチルアンゲリシン、4'-アミノメチルトリオキシサラン (4'-アミノメチル-4, 5', 8-トリメチル-ブソラレン、3-カルボキシー-5-または-8-または-ヒドロキシー-ブソラレン)、ならびにモノ-またはビス-アジドアミノアルキルメチジウムまたはエチジウム化合物。

されている。このような化合物の構造は、次の通りである：



他の有用な光反応性インターカレイターは、ビリジン残基と [2+2] シクロ付加物を形成するフロクマリン類である。アルキル化剤、例えば、ビスクロロエチルアミン類およびエポキシド類またはアジリジン類、例えば、アフラトキシン類、多環式炭化水素のエポキシド類、ミトマイシンおよびノルフィリンAを使用することもできる。

インターカレイター化合物の非制限的例は、アクリジン色素、フェナントリジン類、フェナジン類、フロクマリン類、フェノチアジン類およびキノリン類を包含する。

本発明による核酸成分に結合した標識は、検出可能な物理的または化学的性質を有する任意の化学的基または残基であることができ、すなわち、標識付けは化学的反応または物理的吸着によって実施することができる。標識はインターカレイター化合物へ化学的に結合できる機能的化学的基を有するであろう。このような標識物質は免疫アッセイにおいてよく開発されており、そして一般に、このような方法において有用なほとんどの標識を本発明において応用することができる。とくに有用なものは次の通りである：酵素的に活性な基、例えば、酵素〔クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.) , (1976), 22, 1232; 米国再発行特許第31, 006号および英国特許第2, 019, 408号参照〕、酵素基質（米国特許第4, 492, 751号参照）、補酵素（米国特許第4, 230, 797号および同第4, 238, 565号参照）および酵素阻害剤（米国特許第4, 234, 792

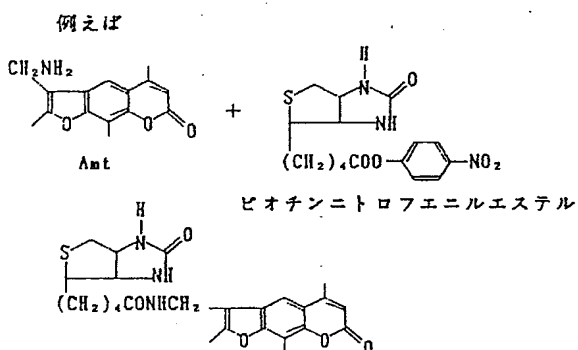
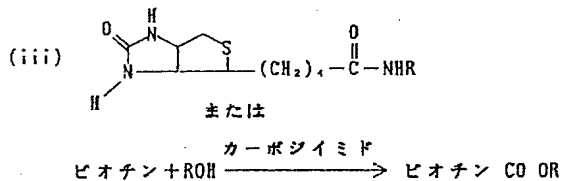
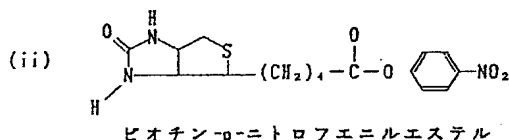
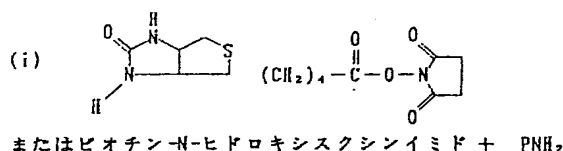
ジオチン）で標識した種は、検出可能な分子で標識した配位子に結合する蛋白質（例えば、アビジン）またはハプテンに対する抗体を添加することによって検出できる。抗原を標識として使用することもできる。このような検出可能な分子は測定可能な物理的性質（例えば、蛍光または吸収）をもつ分子あるいは酵素反応に参加する物質（例えば、上をリストを参照）であることができる。例えば、基質に作用して測定可能な性質をもつ生成物を生成する酵素を使用できる。後者の例は、ペーターガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよびペルオキシダーゼを包含するが、これらの限定されない。その場の交雑の研究のために、理想的には、最終生成物は水不溶性である。他の標識、例えば、色素は、当業者にとって明らかである。

標識はインターカレイター化合物、例えば、アクリジン色素、フェネントリジン類、フェナジン類、フロクマリン類、フェノチアジン類およびキ

号参照）；蛍光性物質〔クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.) , (1979), 25, 353〕；発色団；発光性物質、例えば、化学発光性物質および生物発光性物質（米国特許第4, 380, 580号参照）；特異的に結合性の配位子、例えば、ジオチン（欧州特許明細書63, 879号参照）またはハプテン（PCT発行83-2286号参照）；および放射性同位元素、例えば、 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{125}I および ^{14}C 。このような標識はそれら自身の物理的性質（例えば、蛍光性物質、発色団および放射性同位元素）またはそれらの反応性および結合性（例えば、配位子、酵素、基質、補酵素および阻害剤）に基づいて検出される。例えば、コファクター標識種は、酵素（またはサイクル系を用いる場合複数の酵素）（前記酵素のための標識はコファクターおよび前記酵素のための1または2以上の基質）を添加することによって検出することができる。ハプテンまたは配位子（例えば、

ノリン類へ直接の化学的結合、例えば、共有結合を形成結合により、あるいは間接結合、例えば、マイクロカプセルまたはリボソーム中に標識を組み込み、次いでこれらをインターカレイター化合物に結合することによって結合される。標識をインターカレイター化合物へ結合する方法はこの分野において本質的に知られており、そして任意の便利な方法を用いて本発明を実施することができる。

有利には、インターカレイター化合物は、まず、標識と化学的に結合し、その後核酸成分と結合する。例えば、ジオチンはカルボキシル基を有するので、それをフロクマリンと、フロクマリンの光化学的反応性またはジオチンの生物学的活性を妨害しないで、アミドまたはエステル形成によって、例えば、次のようにして結合することができる：

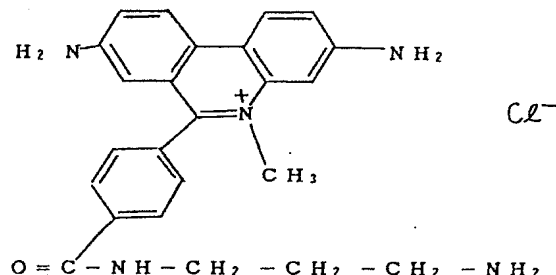


ンジオールジグリシジルエーテルを、再び溶媒、比率および反応条件に関して既知の方法で、使用して光化学的に反応性の分子を標識と直接結合することができ、ここで反応成分はアルキルアミノ残基を有する。ある種の二官能性試薬、多分グルタルアルデヒド、は結合するが、核酸を変性し、こうしてアッセイを妨害することがあるので、適当でないことがある。日常の予備的注意を払ってこのような困難を防止することができる。

標識した核酸を作るとき特定の配列は変更することができる。こうして、例えば、アミノ置換プソラレンを、まず、核酸と光化学的に結合させ、ここで生成物はアミノ側基を有し、この基によってそれを標識または反応性部位へ結合させることができる。あるいは、プソラレンを、まず、標識、例えば、酵素に結合し、次いで核酸に結合させることができる。

係属中の1985年12月18日提出の欧州特許出願第85 116 199.2号に記載され

他のアミノメチルアンゲリシン、プソラレンおよびフェナントリジウム誘導体を同様に反応させることができ、また同様にハロゲン化フェナントリジウムおよびそれらの誘導体、例えば、塩化アミノプロピルメチジウム、すなわち、



を反応させることができる [ヘルツバーグ (Hertzberg) ら、ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティ (J. Amer. Chem. Soc.), 313, (1982) 参照]。

あるいは、二官能性試薬、例えば、ジチオビススクシジニルプロピオネートまたは1,4-ブタ

ているように、本発明は、また、(a) 核酸成分、(b) 核酸成分に光化学的結合した核酸結合性配位子、あ (c) 標識、および (d) (b) および (c) を化学的に結合するスペーサーからなる、標識された核酸を包含する。

有利には、スペーサーは約40原子まで、好ましくは約2~20原子の鎖を含み、前記原子は炭素、酸素、窒素およびイオウから成る群より選択されから選択される。

このようなスペーサーは、ペプチド、炭化水素、ポリアルコール、ポリエーテル、ポリアミン、ポリイミンおよび炭水化物、例えば、-グリシルーグリシルーグリシルーおよび他のオリゴペプチド、カルボニルジペプチド、およびオメガアミノアルカン-カルボニル残基、例えば、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-$ 、スベルミンまたはスベルミン基、アルファ、オメガアルカンジアミン基、例えば、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-$ または $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$ などから成

る群より選択される構成員の多官能性基であることができる。糖、オリエチレンオキシド基、グリセリル、ペンタエリスリトールなどの基は、また、スペーサーの役目をする事ができし。

これらのスペーサーは核酸結合性配位子および/または標識に直接結合することができるか、あるいは結合はカブラー、例えば、ジチオビススクシニミジルプロピオネート、1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテル、ジシソシアネート、カーボジイミド、グリオキサール、グルタルアルデヒドなどの二価の基を含むことができる。

スペーサーはプローブをつくる方法の任意の段階で組込むことができる。

$$a - b - d - c$$

上に定義した。こうして、配列は次の任意のものであることができる：

$$a + b + d + c,$$

$$b + d + c + a,$$

の標識核酸は溶液および固相の交雑フォーマットにおいて使用することができ、後者のフォーマットに場合において、試料またはプローブの核酸を含むフォーマットおよびサンドイッチのフォーマットが包含される。

核酸のプローブは、検出すべき配列に対して実質的に相補的である、あるいはそれと相同の少なくとも1種の一本鎖塩基配列を含むであろう。しかしながら、このような配列は単一の連続のポリヌクレオチドセグメントである必要はなく、非相同配列によって中断された2またはそれより多い個々のセグメントから構成されることができる。これらの非相同配列は直線であるか、あるいは自己相補性でありそしてヘアピンのループを形成することができる。さらに、プローブの相同区域は3'-および5'-末端において、非相同配列、例えば、DNAまたはRNAあるいは伸長のために相同配列が挿入されているベクターによってフランキンク (flanking) されていることがで

$$d + c + b + a,$$

$$b + d + a + c, \text{ など。}$$

個々の工程のための条件は化学においてよく知られている。

標識が酵素であるとき、例えば、生成物は究極的には適当な媒体上の配置され、そして触媒反応の程度を決定する。こうして、酵素がホスファターゼであるとき、媒体はニトロフェニルホスフェートを含有することができ、そして発生したニトロフェノールの量を色の観測により監視する。酵素がベータガラクトシダーゼであるとき、媒体は同様にニトロフェノールを遊離するo-ニトロフェニル-D-ガラクトーピラノシドを含有することができる。

本発明の標識した核酸はすべての普通の交雑アッセイのフォーマットに適用可能であり、そして一般に、多分標識された核酸を含む交雑生成物または凝集物の形成に基づく任意のフォーマットに適用することができる。とくに、本発明の独特

きる。いずれの場合においても、分析試薬として提供されるプローブは問題の試料の核酸で1または2以上の点において検出可能な交雑を示すであろう。線状または環状の一本鎖ポリヌクレオチドをプローブの要素として使用することができ、主要部分または小部分はポリヌクレオチドの1または2以上の鎖と相補的である二重らせんであり、ただし重要な相同の1または2以上のセグメントは一本鎖の形態であり、そして試料のDNAまたはRNAとの交雑に利用可能でなくてはならぬ。有用なプローブは環状プローブであり、ここで相同プローブの配列は本質的に唯一の一本鎖の形態である【とくに、フー (Hu) およびメッシング (Messing)、遺伝子 (Gene)、17:271 (1982) 参照】。

本発明の核酸プローブは普通の交雑技術において使用することができる。改良がなされかつ概念的に新規なフォーマットが開発されたので、これらは本発明に容易に適用することができる。とく

に有用な慣用の交雑フォーマットは、試料の核酸またはポリヌクレオチドプローブを固体の支持体に固定化されるもの（固相交雑）およびポリヌクレオチド種がすべれ溶液中に存在するもの（溶液交雑）を包含する。

固相交雑のフォーマットにおいて、交雑に酸化するポリヌクレオチド種の1つを適当な方法でその一本鎖の形態で固体の支持体へ固定する。有用な固体の支持体はこの分野においてよく知られており、そして共有結合または非共有結合により核酸と結合するものを包含する。一般に疎水性結合を包含する非共有結合の支持体は、天然に産出するポリマー物質および合成ポリマー物質、例えば、ニトロセルロース、誘導化ナイロンおよびフッ化ポリ炭化水素を包含し、これらは種々の形態、例えば、フィルター、ビーズまたは固体のシートの形態である。共有結合する支持体（ちょうど上に述べたフィルター、ビーズまたは固体のシートの形態）は、また、有用であり、そして化

学的に反応性の1または2以上の基を有する物質、例えば、ジクロロトリアジン、ジアゾベンジルオキシメチルなどからなり、それらはポリヌクレオチドへの結合のために活性化することができる。

オリゴヌクレオチドの非共有結合の固定化は固体の支持体、例えば、ニトロセルロース紙の上では無効であることが知られている。本発明は、また、オリゴヌクレオチドの固定化の新規な方法を記載する。これはオリゴヌクレオチドをポリヌクレオチドキナーゼによってホスホリル化することにより、あるいは5'-ホスホリル化オリゴヌクレオチドを結合して、固定化を行うことのできるマルチ-オリゴヌクレオチド分子を生成することによって達成される。キナーゼおよび結合の反応のための条件は、標準の教科書、例えば、分子クローニング (Molecular Cloning)、T. マニアチス (Maniatis)、E. F. フリチシュ (Fritsch) および

J. サンプルック (Sanbrook)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、(1982)、1-123ページに記載されている。

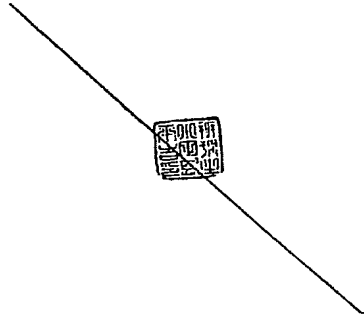
典型的な固体の支持体交雑技術は、支持体に試料の核酸を一本鎖の形態で固定化して開始する。この初期の工程は試料からの相的鎖の再アニーリングを本質的に防止し、そして検出可能性を造作居するために試料の物質を支持体上に濃縮する手段として使用することができる。次いで、ポリヌクレオチドプローブを支持体と接触させ、そして交雑をここに記載するようにして標識をの測定により検出する。固体の支持体は検出すべき配列に対して交雑した標識されたプローブを交雑しなかったプローブから分離するための便利な手段を提供する。

問題の他の方法はサンドイッチ技術であり、ここでプローブの相同配列の2つの相互に排他的な断片の一方を固定化し、そして他方を標識する。

問題のポリヌクレオチド配列の存在は、固定化されかつ標識されたプローブのセグメントの二重の交雑を生ずる。それ以上の詳細については、メソッズ・イン・エンジモロジー (Methods in Enzymology)、65:468 (1980) および 遺伝子 (Gene)、21:77-85 (1983) 参照。

本発明にとって、交雑系の移動相は既知の種類および/または変性されたDNAの1系列またはマトリックスのスポットであることができる。これは適当な小さい体積の自然DNAを乾燥ニトロセルロースまたはナイロンのシート上に沈殿させ、このシートを水酸化ナトリウム溶液上に浮かばせてDNAを変性し、このシートを中和溶液中ですすぎ、次いでこのシートをベーキングしてDNAを固定することによって、最も簡単に調製される。DNA:DNAの交雑前に、交雑の間に付加されたDNAの非特異的結合を阻止する溶液とシートを通常接触させる。

本発明は全ゲノムDNA、細胞中に存在する全核酸、全細胞リゼイト、または溶解されない全細胞を包含する。標識された物質がいったん調製されると、それは検出のために、すなわち、特異的核酸交雑アッセイによりある種の特異的ゲノム配列の存在または不存在を検出するために使用できる。



本発明は驚くべきものである。なぜなら、ヒトゲノム試料において、単一のコピー遺伝子の量は非常に低く、例えば、1000塩基対の制限断片が交雑の区域である場合、全ヒトゲノム試料中のこのような配列の確立は100万分の1であるからである。この結論は、ヒトゲノム試料が 3×10^9 塩基対を有し、そして100塩基対がその数の $1/3,000,000$ であろうという文献から推定することによって誘導された。自動的に、ほぼ5~10 μ gの核酸を含有するヒトDNAの試料において、対応する配列のわずかに5~10ピコグラムが有効であり、そして非特異的DNAのほとんど大部分は真の信号より多くのバックグラウンドを生成するであろう。しかし反応後、結果は特異的であるばかりでなく、かつまた予期されないほどに高い感度を有するということは、驚くべきことである。

操作可能性の特定の理論に拘束されたくないが、予期されない感度についての理由は特異的プ

ロブによる1つの方法はヒト試料からの細胞の分離を含むか、あるいはヒト試料を光化学的に反応性の核酸結合性インターカレイティング (intercalating) 配位子との混合によって直接処理する。この混合物を試料の型に依存してインキュベーションする。試料が溶解した細胞である場合、それは数分~5分の期間の間インキュベーションし、そして全細胞または部分的に溶解した細胞を使用するとき、2分~3時間の間のインキュベーションを用いる。混合およびインキュベーション後、試料混合物全体を特定の波長で光化学的に反応性のDNA結合性配位子と試験試料との間の共有インターカレイションのために照射する。次いで、この標識物質を特定の交雑条件下に特異的プローブと交雑させる。

交雑後、反応しなく交雑しない標識された試験試料を洗浄によって除去する。洗浄後、雑種は試験試料が支持する標識を介して検出され、これは特異的プローブと特異的に交雑される。

ローブへ結合した非特異的核酸雑種の網状組織が形成し、こうして試料の量を増幅したためであろう。典型的な実施例において示すように、プラスミドを含有する19ヌクレオチド長さの特異的配列を固定化し、そして、光化学的に標識された試験試料の5 μ g当量と交雑させ、そしてこのような雑種から得られた信号を非常に容易に検出する。標識付け方法に関連する問題のために、これはいかなる技術によっても達成されなかった。

本発明は新規な交雑技術に関し、ここでプローブを固定化し、そして真核生物の核酸を標識し、そして固定化された標識されないプローブと交雑させる。本発明の1つの驚くべき特徴は、試験試料を標識することによって単一または多数のコピー遺伝子の欠損を検出することである。過剰の標識された交雑配列についての要件は存在しないので、本発明の方法はより特異的である。本発明において、異なる遺伝子の欠損の同時の検出を特異的プローブの固定化によって容易に実施するこ

とができる。

例えば、本発明を用いることによって、鎌型赤血球貧血に関係づけられた遺伝子欠陥について特異的なオリゴヌクレオチドプローブおよびアルファーサラセミアについて特異的なプローブをニトロセルロース紙上に固定化し、試験試料を標識し、そして標識された試験試料を固定化されたプローブと交雑することができる。部分的に精製したあるいは精製しない核酸試料（細胞のリゼイトまたは全細胞）を、特異的な交雑可能性に影響を及ぼさずに、感受性分子で光化学的に標識することができるということは、驚くべきことである。

本発明は、また、高等有機体、例えば、動物またはヒトからの試料中の真核生物（原生生物）を検出することに関する。

真核生物は、藻類、原生生物、菌・カビ類および粘菌を包含する。

用語「藻類」は一般にクロロフィル含有原生生

物を意味し、その説明は次の文献に記載されている：G. M. スミス (Smith), クリプトガミック・ボタニー (Cryptogamic Botany)、第2版、Vol. 1、藻類および菌・カビ類 (Algae and Fungi)、マクグロウ・ヒル、(1955)。

本発明による真核生物の配列は、バクテリアおよびウイルスを除外して、すべての病気の配列を包含する。したがって、例えば、遺伝病は本発明にまた包含される。このような遺伝病の非制限的例は次の通りである：

影響領域

病気

代謝

急性間欠的ボルフィリン症
斑紋状ボルフィリン症
アルファ₁-抗トリプシン欠乏症
細胞性線維症
フェニルケトン尿症
テイザックス症
ムコポリサッカリドーシス (Muc

opolysaccharidos
is) I

ムコポリサッカリドーシス II

ガラクトセミア (Galactos
aemia)

ホモシスチヌリア (Homocyst
inuria)

シスチヌリア (Cystinuri
a)

メタクロミック・ロイコジストロ
フィー (Metachromic
leucodystrophy)

神経系

ハンチングトンのコレア (Hunt
ington's chore
a)

ネウロフィブロマトーシス (Neu
rofibromatosis)

ミオトニック・ジストロフィー (M
yotonic dystroph

y)

チューベロス・スクレロシス (Tu
berous sclerosi
s)

ネウロジェニック・ムスクラー・ア
トロフィース (Neurogeni
c muscular atrop
hies)

血液

鎌型赤血球貧血
ベーターサラセミア
コンフェニタル・スフェロサイトー
シス (Congenital sp
herocytosis)
ヘモフィリア (Haemophil
ia) A

腸

ポリボシス・コリ (Polypos
is coli)

腎

ポリシスチック病 (Polycys
tic disease)

眼	優性盲	(Thanatophoric dwarfism)
	網膜芽腫	
耳	優性早期子供おし (Dominant early childhood deafness)	オスレオゲネス・インパーフェクタ (Osteogenes imperfecta)
	ドミナント・オトスレロシス (Dominant otosclerosis)	マルファン症候群 (Marfan syndrome)
循環系	単性過コレステロール血症	アコンドロプラシア (Achondroplasia)
歯	デンチノゲニシス・インパーフェクタ (Dentinogenesis imperfecta)	エーレース・ダンロス症候群 (Ehlers-Danlos syndrome)
	アメロゲニシス・インパーフェクタ (Amelogenesis imperfecta)	オステオペロシス・タルダ (Osteopetrosis tarda)
骨格	ダイアフィジカル・アクラシア (Diaphysical aclasia)	クレフト・リップ／パレイト (Cleft lip/palate)
	タナトホリック・ドワーフィズム	イチシオシス (Ichthyosis)
		皮膚

運動 筋肉ジストロフィー

本発明による核酸プローブは、試験試料の配列を決定する配列である。プローブは通常DNA、RNA、リボ-およびデオキシリボ核酸の混合コポリマー、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドの残基を含有するオリゴヌクレオチドあるいはそれらの変性された形態である。このようなプローブの配列は試験配列に対して相補的であるべきである。相補的性質の程度は、交雑に形成される二重らせんの安定性を決定するであろう。プローブは、また、共有結合した非相補的核酸を有することができる。それらは標識反応の部位としてはたらくことができる。

核酸は、好ましくは、光化学的手段によって標識され、ここで標識に核酸を結合する光反応性DNA結合性フロクマリンまたはフェナントリジン化合物を使用し、前記標識は普通の方法で、例えば、蛍光検出によって「読む」かあるいはアクセシすることができる。

本発明の1つの用途は、生物学的流体中のバクテリア種の同定である。1つの用途において、尿道の感染を有するか、あるいはそれが疑われる患者からの尿の試料は標識されたDNAまたはRNAの調製のための物質を提供することができ、一方固体の支持体のストリップ、例えば、ニトロセルロースまたはナイロンから作られたストリップは、感染の原因であると思われる、いくつかのバクテリアの各々からの変性し精製したDNAの既知量の個々のドットまたはスポットを含有することができる。

標識された未知プローブおよび標識されないプローブのフォーマットは、標準の方式と逆であり、ある数の可能性のうちで、単一の標識でもってのみ試料中の有機体の種の同定を可能とする。それは、また、試料中の1つより区別可能なバクテリアの種の存在を同時に識別できるようにする（混合物中のDNAは標識手順において識別されないと仮定する）。しかしながら、それは、簡単

な方法で、混合試料中のDNAの量（それゆえ、
バクテリアの濃度）の推定以上のことを可能とし
ない。このような定量のために、試料のDNAを
標準DNAのスポットと一緒に1系列の希釈ス
ポットにおいて固定化す、そしてプローブのDN
Aを標識する。

尿道の感染は、ほとんど常に、次の6種類の微
生物の1つのモノクローナル生長のためである：
大腸菌（UTIの60～90%）、プロテウス種
（UTIの*Proteus spp.*）（UTI
の5～20%）、クレブシエラ種（UTIの*Kl
ebsiella spp.*）（UTIの5～2
0%）、スタフィロコッカス種（*Staphyl
ococcus spp.*）（UTIの4～20
%）、ストレプトコッカス種（*Streptoc
occus spp.*）（UTIの2～5%）、
シュードモナス（*Pseudomonas*）およ
びいくつかの他のグラム陰性かん状菌（rod）
類は一緒になってUTIに低い百分率を説明す

0%のバクテリアを集めることが必要である。感
染がほぼ 10^5 バクテリア/mlを有する尿を生
成する場合、試料から標識すべきバクテリアDN
Aは2000mlから濃縮される。10ngより
多い、例えば、100ngまたは1μgの標識さ
れないプローブDNAをドット中に固定化する場
合、あるいは交雑体積を減少させる場合、標識さ
れた未知の調製に要求される尿の体積はほぼ十
分の1mlである。

固定化され、変性され、標識されないプローブ
のDNAを含有するドットのストリップは、次の
構成を有する：

	1 ng	10 ng	100 pg
大腸菌	0	0	0
プロテウス	0	0	0
クレブシエラ	0	0	0
スタフィロコッ			
カス	0	0	0
ストレプトコッ			

る。不適切な試料の収集のしるしである尿の試料
のふうつの汚染はラクトバシルス（*Lactob
acillus*）である。

尿の試料中の感染を定めるバクテリアの濃度
は、約 10^5 /mlである。

尿道の感染に適用可能な標識しないプローブの
交雑のフォーマットは、上の種のリストからのD
NAのマトリックスを有することであり、これら
は変性され、支持体、例えば、ニトロセルローズ
の上の固定化され、そして標識されない未知の試
料中に期待することのできるバクテリアのDNA
の濃度に適切な量の範囲内にある。

ジオチニル化全ゲノムDNAプローブとの標準
の交雑は、5～10mlにおいて、約0.1μg
/lのプローブ濃度で起こり、約10ngの変性
DNAを含有するスポットへのプローブの交雑は
容易に検出可能である。約5fg/バクテリア細
胞のDNAが存在するので、試料について1μg
の標識されたDNAを含有するためには、 2×1

カス	0	0	0
シュードモナ			
ス	0	0	0
ラクトバシル			
ス	0	0	0

この手順は、組成細胞リゼイト中のDNAまた
はRNAの標識付けを包含する。理想的には、標
識した試料のDNAまたはRNAの調製は次の点
を収容する：

（1）バクテリアを流体試料から遠心または濾
過によって濃縮する；

（2）バクテリアを問題の有機体の最も無反応
性のもの（refractory）から核酸を開
放するために十分な条件下に溶解する；

（3）標識付けのプロトコールは、組込まれな
い先駆体からの標識した核酸の精製を必要とせ
ず、かつまた標識前の核酸の精製を必要としない

(4) 標識付けプロトコールはDNAおよび／または絵核酸に対して十分に特異的であって、調製物中の蛋白質、脂質および多糖類は交雑を妨害せず、また読取りを妨害しないであろう。

本発明において、グラム陽性バクテリアを包含する全細胞を効率よくかつ急速に溶解する方法が提供される。この方法は細胞、例えば、全細胞をアルカリ、例えば、0.1～1.6Nの水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウムの溶液と接触させることを含む。

本発明の溶解のプロトコールの重要な面は、それが比較的簡単でありかつ速度が速いということである。それは特別の貯蔵条件を必要としない普通の化学物質を使用しかつグラム陽性有機体を高い効率で溶解すると同時に、光化学的標識付け法における引続く工程のために重要であるDNAの性質を保存する。

本発明にとって、交雑系の移動相は既知の種類および／または変性されたDNAの1系列また

はマトリックスのスポットであることができる。これは適当な小さい体積の自然DNAを乾燥ニトロセルロースまたはナイロンのシート上に沈殿させ、このシートを水酸化ナトリウム溶液上に浮かばせてDNAを変性し、このシートを中和溶液中ですすぎ、次いでこのシートをベーキングしてDNAを固定することによって、最も簡単に調製される。DNA:DNAの交雑前に、交雑の前に付加されたDNAの非特異的結合を阻止する溶液とシートを通常接触させる。

本発明を次の非制限的实施例によりさらに説明する。これらの実施例において、部は特記しないかぎり重量による。

実施例

実施例1

標識化合物の製造

標識化合物の調製は、1-アミノ-17-N-(ビオチニルアミド)-3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデカンを必要とした。これ

は次の4つの工程により達成した：

(1) 3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデカン1,17-ジオールジトシレートを作成した。

(2) 3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデカンの1,17-ジフタルイミド誘導体を調製した。

(3) 3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデカンの1,17-ジアミノ誘導体を調製した。

(4) 3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデカンの1-アミノ-17-ビオチニルアミド誘導体を調製した。

実施例1(a)：

3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデカン-1,17-ジオールジトシレートの調製

0℃の400mlのCH₂Cl₂中に50gのヘキサエチレングリコール(0.177モル)お

よび64mlのトリエチルアミン(39.36g)を含有する攪拌した溶液に、400mlのCH₂Cl₂中に73.91gのp-トルエンスルホニルクロライド(0.389モル)を含有する溶液を2.5時間かけて滴々添加した。次いで、この混合物を濾過し、そして濾液を真空濃縮した。生ずる不均質残留物を500mlの酢酸エチル中に懸濁し、そして濾過した。次いで、濾液を真空濃縮すると、黄色油が得られ、これを250mlの部分のあたにかいヘキサンで8回粉碎して、未反応のp-トルエンスルホニルクロライドを除去した。次いで、得られる油を高真空下に濃縮すると、108.12gの黄色油が得られた(定量的収率)。

分析：C₂₆H₃₈O₁₁S₂について計算

計算値：C, 52.87；H, 6.48

実測値：C, 52.56；H, 6.39

PMR：(60MHz, CDCl₃) δ: 2.45 (s, 6H)；3.4-3.8 (

m, 20H); 4.2 (m, 4H);
7.8 (AB四重線, J = 8 Hz, 8
H)。

IR: (純粋) cm^{-1} : 2870, 1610,
1360, 1185, 1105,
1020, 930, 830, 785,
670。

実施例1 (b):

1, 17-フタルイミド-3, 6, 9, 12,
15-ペンタオキサヘプタデカンの調製

108gの3, 6, 9, 12, 15-ペンタオ
キサヘプタデカン-1, 17-ジオールジトシ
レート (0.183モル)、74.57gのカリ
ウムフタルイミド (0.403モル) および7
00mlのジメチルアセタミドを含有する攪拌し
た懸濁液を160~170℃に2時間加熱し、次
いで室温に冷却した。沈殿を濾過し、そして水お
よびアセトンで洗浄すると、53.05gの生成
物が白色粉末として得られ、これを55℃ (0.

1mm) で乾燥した。融点125-126℃。

生成物の第2収獲物をジメチルアセタミドの過
液から真空蒸発により得、そして生ずる沈殿を酢
酸エチル、水およびアセトンで順次に洗浄した。
得られる白色粉末を55℃ (0.1mm) で乾燥
すると、追加の9.7gの生成物が得られた。融
点125.4-126.5℃。生成物の合わせた
収量は62.82g (68%の収率) であった。

分析: (第1収獲物)

$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ について計
算

計算値: C, 61.19; H, 6.05; N,
5.09

実測値: C, 61.08; H, 6.15; N,
5.05

分析: (第2収獲物)

$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9$ について計算

計算値: C, 62.21; H, 5.97; N,
5.18

実測値: C, 61.78; H, 6.15; N,
5.13

PMR: (60MHz, dms_o-d₆) δ :
3.5 (s, 8H); 3.6 (s, 8
H); 3.8 (bt, J = 8 Hz, 8
H); 8.1 (s, 8H)。

IR: (KBr) cm^{-1} : 2890, 17
85, 1730, 1400, 1100
、735。

実施例1 (c):

1, 17-ジアミノ-3, 6, 9, 12, 15
-ペンタオキサヘプタデカンの調製

60gの1, 17-フタルイミド-3, 6,
9, 12, 15-ペンタオキサヘプタデカン
(0.118モル)、14.8gのヒドラジン水
和物 (0.296モル) および500mlのエタ
ノールを含有する溶液を機械的に攪拌しながら1
00℃の油浴中で3時間加熱した。次いで、この
混合物を冷却し、次いで濾過した。濾過ケーキを

300mlの部分のエタノールで4回洗浄した。
合わせた濾液を濃縮すると、32.35gの黄色
の不透明のガラス状油が得られた。150-20
0℃ (0.01mm) で蒸発的蒸留を行なうと、
22.82gの淡黄色油が得られた (69%の収
率)。

PMR: (60MHz, CDCl_3) δ : 1.
77 (s, 4H, NH_2); 2.85
(t, J = 5 Hz, 4H); 3.53
(t, J = 5 Hz, 4H); 3.67
(m, 16H)。

IR: (CHCl_3) cm^{-1} : 3640,
3360, 2860, 1640, 15
85, 1460, 1350, 1250
、1100, 945, 920, 870
。

質量分析: (EI) m/e = 281.2
(0.1%, M+1)。
(FAB) m/e = 281.2

(100%, M+1)。

分析: $C_{12}H_{28}N_2O_5 \cdot 1/2H_2O$ について計算

計算値: C, 49.80; H, 10.10;
N, 9.68

実測値: C, 50.36; H, 9.58; N, 9.38

[W. ケルン (Kern), S. イワバチ (Iwabachi), H. サトー (Sato) および V. ボーマー (Bohmer), 高分子化学 (Makrol. Chem.), 180, 2539 (1979)]。

実施例1 (d):

1-アミノ-17-N-(ビオチニルアミド)-3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデカンの調製

75 ml の DMF 中に 7.2 g の 1,17-ジアミノ-3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデカン (25 ミリモル) を含有する溶液

(35%の収率)。

分析: $C_{22}H_{42}N_4O_7S \cdot 3/2H_2O$ について計算

計算値: C, 49.51; H, 8.50; N, 10.49

実測値: C, 49.59; H, 8.13; N, 10.39

PMR: (90 MHz, dms o - d_6) δ :
1.1-1.7 (m, 6H);
2.62 (t, J=4 Hz, 1H);
2.74 (t, J=4 Hz, 1H);
3.0-3.4 (m, 14H);
3.50 (s, 14H); 4.14 (m, 1H); 4.30 (m, 1H);
6.35 (d, J=4 Hz, 1H);
7.80 (m, 1H)。

CMR: (22.5 MHz, dms o - d_6)
 δ : 25.2, 28.0, 35.1,
40.6, 55.3, 59.2, 61

を、アルゴン雰囲気の下で、3.41 g の N-スグシニルビオチン (10 ミリモル) の 1.0 時間にわたる少しずつの添加により処理した。生ずる溶液を周囲温度で 4 時間攪拌した。ジメチルアミノシンナムアルデヒドのスプレー試薬で可視化した TLC (SiO_2 , 70:10.1 の $CHCl_3$ - CH_3OH -濃 NH_4OH) は、新規生成物へのきわめて優れた転化を示した ($R_f=0.18$)。得られる混合物を半分に分け、各半分を SiO_2 上に吸収させ、そして 500 g の SiO_2 -60 (230-400 メッシュ) のフラッシュクロマトグラフィーにかけ、70:10.1 の $CHCl_3$ - CH_3OH -濃 NH_4OH 溶媒混合物で溶離した。生成物を含有する分画をブールし、そして濃縮すると、2.42 g のゼラチン状ワックス状固体が得られた。生成物をイソプロパノール-エーテルから固体として沈殿させ、ヘキサンで洗浄し、そして 55°C (0.1 mm) で乾燥すると、1.76 g の白色粉末が得られた

. 1, 69.6, 69.8, 71.2,
. 162.7, 172.1。

IR: (KBr) cm^{-1} : 2900, 2850, 1690, 1640, 1540,
. 1450, 1100。

質量分析 (FAB) m/e : 507.3 ($M+1$, 56%)。



実施例2: 4'-ビオチニル-PEG-4, 5'-ジメチルアンゲリシンの製造

アルゴン雰囲気下のDMF 1 ml中の1-アミノ-17-N-(ビオチニルアミド)-3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデカン203 mg (0.4ミリモル)の溶液を、N,N-カルボニルジミダゾール(0.48ミリモル)78 mgで処理した。得られる混合物を4時間攪拌し、次いで4'-アミノメチル-4,5'-ジメチルインゲリシン塩酸塩55 mg (0.2ミリモル)、ジソプロピルエチルアミン140 μ l及びDMF 100 μ lで処理した。得られる混合物を50℃で一夜攪拌した。次いで混合物を減圧でSiO₂上に蒸着させ、得られる含浸された固体フラッシュをSiO₂(230-400メッシュ)60 g上にクロマトグラフィーにかけ、7%のCH₂Cl-CHCl₃ 1.5リットルで、続いて10% CH₂OH-CHCl₃ 1リットルで溶出した。生成物を含有するフラクションをプールし、濃縮してガラス状固体72 mgを得た(47%収率)。

参考文献: エフ. ダル' アクア、デー. ベグルディ、エス. カフィエリ、エー. ギョット、ビー. ロジグヒーロー、エフ. バッキケッティ、エフ. カーラッサーレ及びエフ. ボーディン、ジャーナル. オブ. メディシナル. ケミストリー., 24, 178 (1981) (F. Dall'Acqua, D. Vedaldi, S. Caffieri, A. Guiotto, P. Rodighiero, F. Baccichetti, F. Carlassare and F. Bordin, J. Med. Chem., 24, 178 (1981)).

実施例3: 核酸ハイブリッドの比色分析又は化学ルミネッセンス検出

実施例3(a): 比色分析検出

ビオチニル化ハイブリッドの比色分析検出を、ベテスダリサーチラボラトリーズ(BRL)、ゲイザースバーグ、マリーランド20877、ユーエスエー(Bethesda Research Laboratories(BRL), Gaithersburg, Maryland 20877, U.S.A.)により開発された方法及びキットにより行った。その方法は、“核酸検出のための製品”、“DNA検出システムインストラクションマニュアル”、カタ

PMR:(90 MHz, dms_o-d₆): δ 1.1-1.8(m, 6H); 2.04(bt, J=7 Hz, 2H); 2.5(s, 8H); 2.56(m, 1H); 2.74(bd, J=4 Hz, 1H); 2.8-3.4(m, 14H); 3.40(m, 14H); 4.14(m, 1H); 4.25(m, 1H); 4.40(bd, J=6 Hz, 2H); 6.5(m, 1H); 6.35(s, 1H); 7.02(s, 1H); 7.45(d, J=8 Hz, 1H); 7.62(d, J=8 Hz, 1H); 7.80(m, 1H).

CMR:(22.5 MHz, dms_o-d₆) δ : 11.9, 18.9, 25.3, 28.2, 28.3, 33.4, 35.2, 55.4, 59.2, 61.0, 69.2, 69.6, 69.8, 70.0, 89.0, 107.8, 112.0, 113.1, 114.3, 120.6, 121.6, 153.6, 154.4, 155.6, 157.9, 159.5, 162.7, 172.1.



ログ番号8239SA("Products for Nucleic Acid Detection", "DNA Detection System Instruction Manual", Catalogue No. 8239SA)と題するBRLによりキットと共に提供されたマニュアルに記載されている。

実施例3(b): 化学ルミネッセンス検出

ビオチニル化ハイブリッドの化学ルミネッセンス検出は上記の方法に同一である: ハイブリッドを有するろ紙を、3%BSA(ウシ血清アルブミン)中に42℃で20分間浸漬することにより、該ろ紙をBSA(ウシ血清アルブミン)で飽和させる。このろ紙を容器から取り出しそして2枚のろ紙間でプロットングすることにより過剰のBSAを除去する。次いでろ紙をストレプトアビジン(Streptavidin)を含有する溶液(0.25 mg/ml, 3.0 ml全容量)中で、室温で20分間インキュベーションする。次いでそれを、0.1 M トリス-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.05% "トリトンX-100" (TRITON X-100)を含有

する緩衝液で3回洗浄する。次ぎにろ紙をビオチニル化セイヨウワサビパーオキシダーゼ(biotinylated horseradish peroxidase) (0.10 mg/ml) と共に室温で15分間インキュベーションする。この後、0.1 M トリス-HCl、pH 7.5、0.1 M NaCl、2 mM MgCl₂ 及び0.05% トリトンX-100 で3回洗浄し、そして10 mM トリス (pH 8.0) 緩衝液で1回洗浄する。化学ルミネッセンス活性化は2つの方法で行う。(1) スポットをパンチで打ち抜きそしてDNAを含有するディスクを両側を黒く塗られているウエルを持ったマイクロタイタープレートに入れる。打ち抜いた円形紙をマイクロタイタープレートウエルに入れ、40 mM トリス及び40 mM 酢酸アンモニウム (pH 8.1) を含有する緩衝液0.8 mlを各ウエルに加える。次いで39 mM ルミノール(Luminol) (DMF中) 及び30 mM H₂O₂ (水中) の1:1混合物を加える。“ボラロイド”インスタントフィルムをフィルムホルダーにおいて直接露光させることによ

いて通常行なわれる如く透析又はアルコール沈殿(ベ第4,395,486号)により精製することができる。

核酸の代わりに、全細胞溶解物(whole cell lysate)を同じ方法に従ってラベルすることもできる。溶解は細胞を0.1 N 水酸化ナトリウムと共に煮沸し、続いて塩酸で中和することにより行なわれる。

全細胞が使用される場合には、“ペグーアングーバイオ” “PEG-ang-bio” 及び細胞の混合物を、リガンドの有効な輸送のため照射に先立ち少なくとも60分間インキュベーションする。上述の方法の多くの異なる変法をラベリングのために採用することができる。

実施例5:

α-サラセミア(Alpha-thalassemia)は遺伝子欠失と関連している。ドット/スロットブロットフォーマット(dot/slot blot format)におけるハイブリダイゼーションによる遺伝子欠失の検出は、サンプルの全量及びそのハイブリッド形成能力(f

り、発光(light emission)を“ボラロイド”インスタントフィルムに記録する。別法として(b)、ろ紙を0.5 mM ルミノール及びH₂O₂の1:1混合物を含有する溶液中に浸け、そして透明な“サランラップ”(SARAN WRAP)で包む。発光は上述の如くして“ボラロイド”フィルムに記録される。

実施例4: 試験サンプル核酸をラベルするための一般的方法

患者のサンプルからの高分子量DNAを米国特許第4,395,486号(ウイルソン他)に記載の方法により単離する。核酸を10 mM ホウ酸塩緩衝液(pH 8.0)中に溶解して、最終濃度約20 µg/mlとする。この核酸溶液に、水溶液中の“アングリシン-ペグーバイオチン”(“anglicin-peg-biotin”)を加えて最終濃度約10 µg/mlとする。次いで混合物を、ブラックレイUV L56 ランプ(black ray UVL 56 lamp)を使用して約60分間長波長照射で照射する。生成物は精製することなくハイブリダイゼーションする用意ができています。しかしなが、生成物は、核酸につ

ybridizability)が正確に知られていることが必要である。β-グロビン遺伝子(beta-globin gene)はシングルコピー遺伝子(single copy gene)であるので、β-グロビン及びα-グロビンを有するサンプルの同時的ハイブリダイゼーション及びそれらの相対的量はサンプルについてのα-グロビンの量を示すであろう。

フォーマット及びハイブリダイゼーション条件はプローブを除いては、前述のルビン及びカン(Rubin and Kan)と同じであり、試験DNAは固定化されていない。ハイブリダイゼーション条件も同様である。検出は、BRLの明細に従って前述のBRLキットを使用することによりなされる。

ハイブリダイゼーション検出プロセスは下記の3工程で行なわれる:

工程1: プローブの固定化

前述のルビン及びカンに記載の如く、α₂グロビン遺伝子(alpha₂ globin gene)を含有する1.5 kb Pst I フラグメントをα-サラセミアのためのプローブとして使用し、そしてβ-グロビ

ン遺伝子についてはpBRβPst(pBR beta Pst) (4.4 kb)の消化により生成した737塩基対プローブを使用する。β-グロビン遺伝子プローブは米国特許第4,395,486号(4欄)に記載されている。α-サラセミアに関連した遺伝子欠失の検出のために、出発核酸の量、ハイブリダイゼーション効率及び対照サンプルが必要である。本発明は、同様な量のプローブが並んで固定化されている場合には、シングルコピー必須遺伝子(single copy essential gene)(たとえば、β-グロビン遺伝子)との同時的ハイブリダイゼーションによりこれらの問題を回避し、ラベルされたサンプルはハイブリダイズされ、シグナル強度(signal intensity)の相対的強度はサンプルに存在する遺伝子量の相対的量の目安である。

プローブ(0.5, 1, 3, および5 μg/100 μl)を、3 M水酸化ナトリウム20 μlで変性された10 mMトリスHCl (pH 7)中に100℃で5分間再懸濁させ、当容量の2 M酢酸アンモニウム、pH 5.0を加えて溶液を中和し、中

固定化されたプローブを含有するニトロセルロースストリップをプラスチックバッグ(例えば、“シーラーアーミール”(“SEAL-A-HEAL”)、“シーラーアンドセーブ”(“SEAL and SAVE”、等)中でラベルされた試験サンプルとハイブリダイゼーションさせる。ハイブリダイゼーション溶液はプレハイブリダイゼーション溶液+10%デキストランサルフェートと同じである。ハイブリダイゼーションは42℃で16時間なされる。ハイブリダイゼーションの後、ビオチンの検出は、ベテスダリサーチラボラトリーズ(BRL)、マリーランド、ユーエスエー(Bethesda Research Laboratories, Maryland, U.S.A.) (カタログ番号8239SA)により提供されたキット及び方法によって行う。α-グロビン遺伝子の欠失の程度を評価するために、α-及びβ-領域の相対強度が使用される：

α-グロビン側にシグナル無し：4つのα-グロビン遺伝子はすべて欠けている。

α-グロビン側のシグナルが対応するβ-側の

和の直後に、スクライヘルアンドシュエル(Schleicher and Schuell)、(キーニ、ニューハンプシャー、ユーエスエー(Keeni, New Hampshire, U.S.A.))から購入した、スロットプロットマニホルド(slot blot manifold)中の真空下のニトロセルロースろ紙に、β-及びα-グロビン遺伝子のためのプローブが平行列で施される。次いでろ紙を真空中で80℃で60分間乾燥する。次いで、それは、50 mMリン酸ナトリウム(pH 7) 45 mMクエン酸ナトリウム、450 mM塩化ナトリウム、50% (v/v)ホルムアミド、各々0.2% (w/v)のポリビニルピロリドン、“フィコール400”(“FICOLL 400”)及びウシ血清アルブミン、及び0.2 mg/mlのアルカリ煮沸サケ精子DNA及び0.15 mg/mlの酵母RNA、を含有する混合物中で4時間アレハイブリダイズされる。

工程2： 試験サンプルのラベリング

これについては前述した。

工程3： ハイブリダイゼーション

シグナルの半分の強度である：3つのα-グロビン遺伝子が欠けている。

α及びβ側のシグナルが等しい：2つのα-グロビン遺伝子が欠けている。

α側のシグナルが対応するβ側のシグナルより強い(2α=3β)：1つのα-グロビン遺伝子が欠けている。

実施例6： ヘモグロビン突然変異に特異的なオリゴヌクレオチド配列の固定化

オリゴヌクレオチドは単一の吸着プロセスによってはニトロセルロース紙上に容易に固定化され得ないことが知られている。本発明は、吸着能力のある大きい分子にオリゴヌクレオチド配列を編入するための3つの異なった方法を包含する。

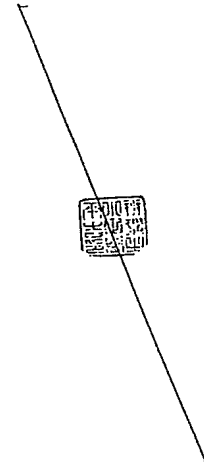
方法1： 1つは43マーでありもう1つは16マーである2つのオリゴヌクレオチドを、ホスホールアミダイト法(phosphoramidite-method)により自動化合成装置(アプライドバイオシステム380B(Applied Biosystem 380B))において化学的に合成し、そしてマニアチス等、モレキュラー

クローニング、122頁(Maniatis et al, Molecular Cloning, page 122)に従う。T4-ポリヌクレオチドキナーゼ介在プロセス(T4-polynucleotide kinase mediated process)により5'端でリン酸化された。これらのオリゴヌクレオチドは鎌状赤血球貧血(sickle cell anemia)と関連した突然変異の検出に特異的な19ヌクレオチド長さの配列のセグメントを含有する。

43マーA & S(43mer A & S)(A=正常グロビン遺伝子、S=鎌状グロビン遺伝子)は、2つの別々の反応、1つは ^{32}P -ATPとのそして1つは放射性ラベルを持たないATPとの反応において、マニアチス等、モレキュラー クローニング、122頁(Maniatis et al, Molecular Cloning, page 122)に従ってキナーゼ処理された(kinased)。0.4 μg ^{32}P -43マー及び0.6 mg放射能のない43マー(cold 43mer)を混合しそしてスパンカラム[TE(トリスEDTA緩衝液)中のG-25med]上で精製して、最終容量40 μl とした。2つの希釈物を、50及び0.5

ngでS & S[シュライヘル及びシュエル(Schleicher & Schuel)]ニトロセルロース及びナイトラン(nytran)(ナイロン)膜上にスポットした。

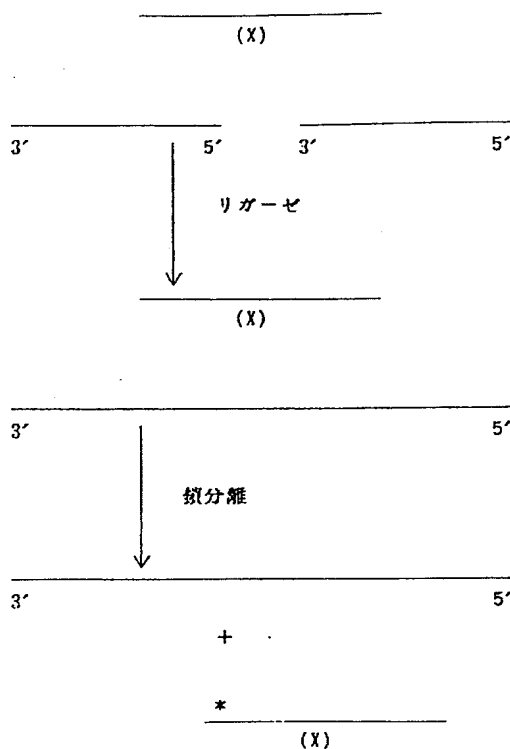
方法2: 方法1のリン酸化されたオリゴヌクレオチド生成物を、リガーゼ介在プロセスにより配列のマルチマー(multimer)をつくることにより更に伸長させた。原理は下記の如く説明される:



生成物がオリゴヌクレオチドよりも高い分子量であるならば、それはニトロセルロース紙への吸着により固定化されるであろう。

^{32}P 43マー 4 μg 及び 16マーリンカー(X) 3.7 μg を含有する水性溶液を混合し、そして真空下に乾燥した。放射能のないキナーゼ処理43マー(cold kinased 43mer) 6 mgを加えそしてサンプルを55℃に加熱し、そして0℃にゆっくりと冷却してアニーリングした。連結反応(ligation)は、20 μl 全反応容量で800単位のリガーゼ[ファーマシア(Pharmacia)]により15℃で4時間行った。スパンカラム上で1 mg(2 μl)を精製して40 μl の最終容量とした。2つの希釈物を50及び0.5 ngでニトロセルロースナイロン膜上にスポットした。

方法3: 方法2と同じであるが、連結反応は行わなかった。連結反応の代わりに、インターカレーター(interpolator)により架橋を行って2本鎖領域を無傷に(intact)保った。この故に、架橋された分子は相互に共有結合した幾つかのオリゴヌ



クレオチド配列を有するであろう。

³²P 43マー（配列P-50のための）2 μ g を16マー（配列P-50のための）リンカー-2.9 mgに加え、そしてスパンカラム（TE中のG 25 me d）上で精製して40 μ lの最終容量とした。キナーゼ処理した43マー6 mgを加え、サンプルを55℃に加熱し、そして0℃にゆっくりと冷却してアニーリングした。インターカラーション化合物アミノメチルトリオキサレン(aminomethyltrioxsalen) 25 μ lを加え、サンプルを全部で500 μ lの10 mMホウ酸塩緩衝液pH 8.2中の氷上で長波UVランプモデル（UVL-21、 $\lambda = 366$ nm）で30分間照射した。

すべての3つの方法により修正されたプローブを、次いでニトロセルロース及びナイロン紙上に固定化し、そしてラベルされたオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションした。結果は、配列が固定化されることができそしてハイブリダイゼーション忠実度(hybridization fidelity)はその

リボヌクレオチドプローブを固定化することにより特異的なハイブリダイゼーションが得られることを示す。

実施例7: 非放射性検出のためのラベルされたゲノムDNAとのハイブリダイゼーション

ヒト正常ゲノム(XX) DNA(human normal genomic (XX) DNA)を、“ビオチン-PEG-アングリシン”(BPA)により、10 mMホウ酸塩緩衝液pH 8.2中で、0.3対1(BPA:DNA)の重量比で、長波UVランプモデルUVL-21、 $\lambda = 366$ nmを使用して、氷上で15分間フォトラベルした(photolabeled)。精製は必要ない。

ターゲットDオリゴヌクレオチドを、下記の濃度で1 μ lアリコートにおいてS & Sニトロセルロース上に直接固定化し、次いで真空オーブン中80℃で30分間ベーキングした。種々の異なる固定化されたプローブの量は下記のとおりである

ままであることを示す。

方法1乃至3の生成物の2つの希釈物を、50及び0.5 ng sでニトロセルロース及びナイロン膜上にスポットティングした。

全体のろ紙を真空オーブン中で80℃で30分間ベーキングし、そして50℃のオーブンで30分間ブロット(blotto) (5%脱脂牛乳、6 X S S C、20 mM Na-ピロホスフェート)中でプレハイブリダイゼーションした。

ハイブリダイゼーションは、プライマー延長19' A & 19 S' (primer extend 19' & 19S') を使用して50℃で1時間行った(3ストリップ/プローブ)。

ろ紙は、僅かに攪拌しながら6 X S S C中で室温にて15分間及び57℃で2 X 10分間ストリレンジントリーに(stringently)洗浄した。

空気乾燥したろ紙をホワットマンろ紙上に置きそして-70℃で一夜オートラジオグラフィーにかけた。

驚くべきことに、第1図に示された結果は、オ

43-mer (A)-キナーゼ処理された(方法1)	200ng
43-mer (A)	200ng
43-mer (S)-キナーゼ処理された(方法1)	200ng
43-mer (S)	200ng
M1319 A ss	50ng
M1319 S ss	50ng
M13737 A ss	50ng
BRL市販のビオチニル化 DNA	200pg
puc19	50ng
43-マー <u>A</u> : 5' CTGCT, AATCTTAAGGAT, AAT, CTCCTGA GCAGAAGTCTGCT, AATCTTAA5, GGAT, AAT, CT 3'	
43-マー <u>S</u> では・=T	
16-マー(A及びSの両者に共通)	
3'-TTAGAATTCCTAAAT-5'	



ろ紙を45℃H₂O浴中でプロット(5%脱脂乾燥牛乳、6XSSC、20mMNa-β-ヒドロキソフェート)においてアレハイブリダイゼーションした。

4つのストリップのすべてを、正常β-グロビン遺伝子を含む2μgのラベルされたXXDNAを含む溶液(ハイブリダイゼーション溶液は10%PEGを含むプロットであった)2ml中で、H₂O浴中45℃で2時間ハイブリダイゼーションした。

ストリンジェンシー洗浄(stringency wash)は下記の如く行った:

6XSSC中で室温にて1X20'、

第2図に示された温度で2X20'、

非常に僅かに攪拌。

高められた温度には50mlの遠心分離管を使用した。結果を第2図に示す。

ハイブリッド中のビオチンの検出は、ベテスダリサーチラボラトリー、ベテスダ、マリーランド、ユーエスエー(Bethesda Research Laboratory, B

8, 1961)]。DNA溶液を37℃で0.2mg/mlリボヌクレアーゼで処理することにより、核酸調製物からRNAを除去し、次いで2容量のエタノールの添加により溶液から核酸を沈でんさせた。TE(10mMトリス-HCl、pH7.5、1mMNa₂EDTA)の如き低塩緩衝液中で沈でん物から再溶解したバクテリアDNAは、純度濃度及び分子寸法について特性付けられ、次いで約1μgのアリコートを変性しそしてハイブリダイゼーションのためにニトロセルロース又はナイロン膜上にスポットとして固定化した(カファトス等、ヌクレックアシッド、リサーチ、7、1541-1552(1979)(Kafatos et al., *Nucleic Acids, Res.* 7, 1541-1552, (1979))。変性は、約0.1N NaOHにDNAをさらすことにより達成された。変性の後、溶液を中和し、次いで膜をNaCl/トリス-HCl、pH7.5、中で洗浄しそして乾燥した。

実施例9: 細胞DNAラベリングのための試験サンプルの処理

ethesda, Maryland, U.S.A.)のマニュアルに従って、ビオチン検出キットを使用して行った。結果は特異的ハイブリダイゼーションを示した。

実施例8: プローブとしての全ゲノムDNA(Whole Genomic DNA)の固定化

発酵槽培養物から回収したバクテリア細胞から下記の方法で、数10ミリグラム乃至グラムの量のDNAを調製した。ニューブルンスウィックサイエンティフィックマイクロファーム fermentor(New Brunseick Scientific Microfermentor)中で増殖した10ℓの普通ブイオン培養物(nutrient broth cultures)からの遠心分離により、バクテリアを集めた。一般に、濃厚懸濁液中の細胞を、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)の如きイオン性洗剤にさらすことにより溶解し、次いでフェノール及び/又はクロロホルムでの抽出によりタンパク質及び脂質から核酸を精製した[ジェー、マーマー、ジャーナル、オブ、モレキュラー、バイオロジー、3、208-218、1961(J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, 3, 208-21

[以下のことは淋病の疑いのあるスワブ(gonorrhea-suspect swab)、髄膜炎の疑いのある脳脊髄液(meningitis-suspect cerebrospinal fluid)、汚染水サンプル等からの物質の懸濁液にも等しく当てはまるけれども]例えば尿のサンプルを、遠心分離し又はろ過して洗浄しそしてサンプル中のバクテリアを濃縮する。次いで、バクテリアは、(i) 2mg/mlのリゾチーム又はリソスタフィンにさらし次いで約90℃の熱にさらすこと、(ii) 0.1乃至1.6N NaOH、又は(iii) 1%ドデシル硫酸ナトリウム、により溶解される。(ii) NaOHの後、細胞溶解物溶液はラベリングの前に中和され、(iii) 洗剤溶解の後、DNAラベリングの前に、氷上の5M酢酸カリウムによりSDSが除去される。DNAラベリングが細胞溶解の前に達成されるように、アンゲリシンは無傷の細胞を透過することができなければならない。このその場のラベリングは抽出工程を簡単にする。その理由は、アルカリ又は洗剤溶解物はハイブリダイゼーション溶液に直接導入されうるからであ

る。

ハイブリダイゼーションの前に、ラベルされたサンプルは変性され、そしてそれは好ましくは、適当なラベルされていないプローブDNAとの特異的アニーリングを促進するために短い1本鎖の長さに減少させられるべきでもある。変性の方法は当業界では知られている。これらの方法には、水酸化ナトリウム、有機溶媒、加熱、酸処理及びそれらの組み合わせによる処理が包含される。フラグメント化は、DNAをNaOH中で所定の時間約80℃に加熱することにより制御された方法で達成することができ、これは、もちろんDNAを変性する。

実施例10：実施例9の生成物のラベリング

(i) 約10mlの尿の試験サンプルは、約10⁴個又はそれより多くの感染物質を含有するであろう。遠心分離及び洗浄の後、予備処理した細胞溶解物(工程2)は、10mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH約8)0.2ml中に再懸濁させた。この懸濁液に、エタノールに溶解したフォト

(iii) 溶解されていない細胞が使用される場合には、10mMホウ酸塩0.2ml中の細胞懸濁液は、照射の前にフォト試薬と共に1時間インキュベーションされた。

実施例11：実施例8及び10の生成物のハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションの前に、変性されたラベルされていないプローブDNAのスポットを有する膜を、“プレハイブリダイゼーション”溶液で2時間までの期間処理して、ハイブリダイゼーションプローブに結合することができる膜自体の部位をブロックした。変性されたラベルされたサンプルDNAも含有していたこの及びハイブリダイゼーション溶液は、約0.9MNa⁺、0.1%SDS、0.1-5%ウシ血清アルブミン又は脱脂乾燥乳及び場合によりホルムアミドから成っていた。50%ホルムアミドでは、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション工程は約42℃でなされ、ホルムアミドがない場合には、温度は約68℃であった。プレハイブリダイ

ラベリング試薬(10mg/ml)10μgを加え、ボルテックスミキサー上で振とうすることにより混合した。次いで、長波長設定でUVGL25装置により365nmで30分間混合物を照射した。このUVGL装置は、UVP社.,5100ウォルナットグローブアブニュー、ビー、オー、ボックス1501、サンガブリエル、シーエー91778、ユーエスエー(UVP Inc., 5100 Walnut Grove Avenue, P. O. Box 1501, San Gabriel, CA 91778, U.S.A.)により販売されている。

(ii) DNAについてのフォスター等(1985)の、前述により記載の方法に従って、N-(4-アジド-2-ニトロフェニル)-N'-(N-d-ビオチニル-3-アミノプロピル)-N'-メチル-1,3-アロバンジアミン〔ブレサ、ジー、ビー、オー、ボックス498、アデライデ、南オーストラリア5001、オーストラリア(BRESA, G.P.O. Box498, Adelaide, South Australia 5001, Australia)から入手可能である〕によってもサンプルはラベルされた。

ゼーションされた膜はしばらくの間貯蔵することができる。DNAハイブリダイゼーションは約10分間又はそれより長く行わせ、次いで、結合していないラベルされたDNAは、不十分な塩基対のハイブリッドを解離する、0.018MNa⁺(0.1XSSC)、0.1%SDS、68℃、の如き条件下に膜から洗浄された。ハイブリダイゼーション後の洗浄の後、膜は、ハイブリダイゼーション検出工程を予想して、洗剤なしの低塩溶液中で洗浄された。

実施例12：イムノゴールド(Immunogold)による核酸ハイブリッドの検出

アフィニティー単離ヤギ抗ビオチン抗体(affinity isolated goat anti-biotin antibody)〔ザイメッドラボラトリーズ、サンフランシスコ、カリフォルニア、ユーエスエー(Zymed Laboratories, San Francisco, California, U.S.A.)から購入した〕をコロイドゴールド(colloidal gold)(20nm)上に、その供給者〔ジャンセンインストラクションパンフレット、ジャンセン ライフ

サイエンス プロダクト、ビスカタウエー、ニュージャーシー、ユーエスエー(Janssen Instruction booklet, Janssen Life Sciences Products, Piscataway, New Jersey, U.S.A.)) によって記載された方法に従って吸着させ、そして比色法における如くしてブロッキングの後ハイブリダイズドビオチニル化DNA (hybridized biotinylated DNA)と反応させた。シグナルは、ジャンセン [B2340、ビールス、ベルギー(B2340 BEERS E, Belgium)] シルバーエンハンスメントキット(silver enhancement kit)及びプロトコルを使用してシルバーエンハンスされた。

実施例13: 尿サンプル中の尿道感染の検出

病院で微生物学的方法により分析された尿サンプルを病院から集め、そして結果はハイブリダイゼーション診断が行なわれるまで秘密にされた。次いでそれらを比較してハイブリダイゼーションの結果の確実性を確かめる。

UTI 感染の疑いのある臨床サンプル(尿) 1 mlを、ブリンクマンマイクロ遠心分離機(Brinkman microcentrifuge)で5分間遠心分離した。次いで1.2 N水酸化ナトリウム0.1 mlを加え、懸濁液を100℃に加熱して細胞を溶解させた。次いで懸濁液を10 mMホウ酸ナトリウム緩衝液 pH 8で1 mlに希釈し、塩酸で中和してpH 7にした。溶液に、50 µg “ビオチン-PEG-アングリシン”(実施例2参照)を加え、混合物をUVL56長波長UVランプで15分間照射した。照射されたサンプル(0.1 ml)を0.2 mMピロリン酸ナトリウムを伴う5%脱脂乾燥乳10%PEGの3XSSC 3 mlに加え、そしてニトロセルロース紙に固定化されたプローブ(全ゲノムDNA)とのハイブリダイゼーションを68℃で5分乃至一夜行った。ハイブリダイゼーションの後、実施例3又は12に従って検出を行い、試験サンプル中の特異的バクテリアの存在について、スポット又は写真を視察により解釈した。ヒトDNAのスポットは白血球の検出のためのニトロセルロース紙にも存在していた。白血球の存在は“ロイコスティックス”(“LEUKOSTIX”)(マイ

ルストラボラトリース、エルカート、インディアナ、ユーエスエー(Miles Laboratories, Elkhart, Indiana, U.S.A.))を使用する普通の方法によって更に証明された。

典型的な結果(表1及び2)は、ハイブリダイゼーション診断は対応する微生物学的アッセイよりも短い時間に同様な結果を生じることを示す。本発明は、種同定に関する情報を与えるのみならず臨床サンプルの白血球含有率も与える。



表 1

臨床的尿サンプルの診断

* 病院の 診断	出願人のハイブリ ダイゼーションの結果	検出系
無視(NEG)	無視(NEG)	ゴールド比色法 (GOLD)
" (NEG)	" (NEG)	" (GOLD)
" (NEG)	" (NEG)	" (GOLD)
" (NEG)	E.C.-M	化学ルミネッセンス (CHEMI)
" (NEG)	E.C.-VM	ゴールド比色法 (GOLD)
" (NEG)	E.C.-VM	" (GOLD)
S+, C-	NEG	ゴールド比色法 (GOLD)
S+, C-	E.C.-S	化学ルミネッセンス (CHEMI)
S+, C-	E.C.-S, KI.-M	" (CHEMI)
S+, C-	無視(NEG)	ゴールド比色法 (GOLD)
S+, C-	" (NEG)	" (GOLD)
S+, C-	" (NEG)	" (GOLD)
S+, C-	E.C.-VM	" (GOLD)
S+, C-	無視(NEG)	" (GOLD)

S+, C-	E.C.-VM	"	(GOLD)
S+, C-	無視 (NEG)	"	(GOLD)
S+, C-	無視 (NEG)	"	(GOLD)
100,000/mL E.C.	E.C.-S	ゴールド比色法 (GOLD)	
100,000/mL E.C.	E.C.-S	化学ルミネッセンス (CHEMI)	
100,000/mL E.C.	E.C.-W	ゴールド比色法 (GOLD)	
50,000/mL E.C.	E.C.-M	化学ルミネッセンス (CHEMI)	
50,000/mL E.C.	無視 (NEG)	ゴールド比色法 (GOLD)	
大腸菌 (E.coli)	E.C.-S, KI.-M	化学ルミネッセンス (CHEMI)	
" (E.coli)	E.C.-VS, KI.-S	"	(CHEMI)
" (E.coli)	E.C.-S, KI.-S	"	(CHEMI)
大腸菌 (E.coli)/ クレブシエラ (Klebsiella)	E.C.-S, KI.-W	ゴールド比色法 混合物	(GOLD)
大腸菌 (E.coli)/ スタフィロコッカス (Staph) 混合物	E.C.-S, St.-M	化学ルミネッセンス (CHEMI)	
クレブシエラ (Klebsiella) spp.	E.C.-M, KI.-W	化学ルミネッセンス (CHEMI)	

ンテロバクターに関連した種とのクロスハイブリダイゼーション (cross-hybridization) は検出されなかった。

略記号: VS = 非常に強い, S = 強い, M = 中程度, W = 弱い, VM = 非常に弱いハイブリダイゼーションシグナル。

ゴールド比色法 (GOLD) = 実施例12に従う検出方法
化学ルミネッセンス (CHEMI) = 実施例3(b)に従う
化学ルミネッセンス検出、

100,000/mL クレブシエラ ニューモニア (K.pneumoniae)	E.C.-M, KI.-VM	ゴールド比色法 (GOLD)	
エンテロバクター (Enterobacter) spp.	無視 (NEG)**	"	(GOLD)
100,000カンジダ (Candida)	無視 (NEG)**	"	(GOLD)
100,000/mL プロテウス (Proteus)	pr.-S, E.c.-W	"	(GOLD)
10,000/mL ストレプト コッカス (Strep)	無視 (NEG)	化学ルミネッセンス (CHEMI)	
3種の同定されて いない G _m (+) の 混合物	" (NEG)	ゴールド比色法 (GOLD)	

* 寒天プレート上で尿を画線培養し (Streaking)

そして感染微生物が増殖できるような条件下に
プレートを処理することにより行なわれた診断

** エンテバクター/カンジダブローブはハイブリ
ダイゼーションアッセイには含まれておらず、
故に負の結果は驚くにはあたらない；
アッセイに使用された高いストリンジエンシ
ー (Stringency) 条件が与えられた場合には、エ

本発明のハイブリダイゼーションの結果は検出後に得られたハイブリダイゼーションシグナルの強度の主観的な解釈の結果を表す。2欄に記載された生物からのDNAはハイブリダイゼーションシグナルが得られた唯一の生物である。ハイブリダイゼーションにしようされるDNAのパネルには、大腸菌 (*E. coli*) ("E.C."), クレブシエラ ニューモニア (*Klebsiella pneumoniae*) ("KI"), プロテウス ブルガリス (*Proteus vulgaris*) ("Pr"), アゾイドモナス エルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*), スタフィロコッカス エピデルマチス (*Staphylococcus epidermatis*) ("SE"), ストレプトコッカス ファエカリス (*Streptococcus faecalis*) 及び ホモサピエンス (*Homo sapiens*) が包含される。

表 2

アノスロイコススティックスアッセイ (AMES
LEUKOSTIX ASSAY) と本発明のアッセイとの比較

“ロイコス スティックス” 結 果	本発明のハイブリ ダイゼーション 結 果	検 出 薬
3+	VS	ゴールド比色法 (GOLD)
3+	S	化学ルミネッセンス (CHEMI)
3+	S	“ (CHEMI)
3+	M	“ (CHEMI)
3+	M	“ (CHEMI)
3+	S	ゴールド比色法 (GOLD)
3+	S	“ (GOLD)
3+	VS	“ (GOLD)
3+	VS	“ (GOLD)
3+	VS	“ (GOLD)
3+	VS	“ (GOLD)
2+	S	化学ルミネッセンス (CHEMI)
2+	S	“ (CHEMI)
“ (NEG)	M	“ (CHEMI)
“ (NEG)	VW	ゴールド比色法 (GOLD)
“ (NEG)	VW	“ (GOLD)
“ (NEG)	無視 (NEG)	“ (GOLD)
“ (NEG)	“ (NEG)	“ (GOLD)
“ (NEG)	W	“ (GOLD)
“ (NEG)	W	“ (GOLD)
“ (NEG)	W	“ (GOLD)

2+	S	“ (CHEMI)
2+	S	“ (CHEMI)
2+	S	ゴールド比色法 (GOLD)
2+	S	“ (GOLD)
2+	S	“ (GOLD)
2+	S	“ (GOLD)
2+	S	“ (GOLD)
1+	S	ゴールド比色法 (GOLD)
1+	VS	“ (GOLD)
1+	VW	“ (GOLD)
痕跡量 (TRACE) /1+	M	化学ルミネッセンス (CHEMI)
“ (TRACE)	VS	“ (CHEMI)
“ (TRACE)	W	ゴールド比色法 (GOLD)
“ (TRACE)	W	“ (GOLD)
“ (TRACE)	VS	“ (GOLD)
無視 (NEG)	S	化学ルミネッセンス (CHEMI)
“ (NEG)	S	“ (CHEMI)

表2の2欄に要約されたハイブリダイゼーションの結果は、表1に記載のラベルされた尿サンプルをゲノムヒトDNAとハイブリダイゼーションさせた場合に得られたハイブリダイゼーションシグナルの強度の主観的解釈を表す。

“ロイコススティックス”アッセイは、比色試薬ストリップアッセイである。試薬ストリップ上の発色はアッセイ試薬ストリップで与えられたチャートと比較され、そして負（発色なし）から3+（非常に強い発色）までの範囲にある。

実施例14：細胞の溶解

細胞懸濁液のアリコート1.0mlを遠心分離し、そして細胞ペレットを緩衝化されていないNaOH溶液100μl中に再懸濁させた。次いでサンプルを短い時間高温にさらし、次いで10mMホウ酸塩緩衝液を使用して初めの容量に希釈した。次いで溶液のpHをHClで中性に調節した。

表4は、68℃又は100℃で種々のNaOH濃度での、2種の異なる球菌、スタフィロコッカス エピデルミディス (*Staphylococcus epidermi*

dis)及びストレプトコッカス ファエカリスの溶解の効率を示す。この実施例においては、遠心分離の前に600nmでの10mlアリコートの吸光度を記録した。遠心分離の後、細胞ペレットを種々の濃度のNaOH(100μl)に再懸濁させ、そして各々の二重サンプルを68℃に10分間又は100℃に5分間さらした。次いで各サンプルを1.0mlに希釈し、再び600nmでの吸光度を記録した。初めの容量及び終わりの容量は同じであるので、600nmでの初めの吸光度及び終わりの吸光度は溶解効率の直接の目安を与える。

グラム陰性生物は0.1N NaOHという低いNaOH濃度で効率良く溶解したが、表4は、効率的な溶解が、インキュベーション温度が減少するにつれてより高いNaOH濃度が必要とされるような、NaOH濃度及び温度の両者の関数であることを明白に示す。100℃(1気圧で最大温度)では、スタフィロコッカス エピデルミデイス及びストレプトコッカス ファエカリスの効率

的な溶解のためには、少なくとも1.6N NaOHの濃度が必要である。より低い温度が望ましいか又は必要である場合には、溶解効率を維持するためにはより高いNaOHの濃度が必要である。



表 3

68℃及び100℃におけるNaOHの種々の濃度でのグラム陽性菌の溶解の効率

ストレプトコッカス ファエカリス

[NaOH]	100℃/5分			68℃/10分		
	OD600前	OD600後	%溶解	OD600前	OD600後	%溶解
0 N	0.475	0.366	23	0.512	0.357	30
0.1	.509	.261	50	.513	.238	54
0.2	.512	.194	62	.513	.259	50
0.4	.504	.175	65	.513	.150	71
0.8	.508	.113	78	.505	.147	71
1.2	.498	.082	84	.498	.150	70
1.6	.487	.061	88	.426	.099	77

スタフィロコッカス エピデルミデイス

[NaOH]	100℃/5分			68℃/10分		
	OD600前	OD600後	%溶解	OD600前	OD600後	%溶解
0 N	0.667	0.558	16	0.690	0.560	19
0.1	.681	.398	42	.701	.441	37
0.2	.674	.296	60	.699	.414	41
0.4	.699	.183	74	.730	.309	58
0.8	.705	.091	87	.715	.187	74
1.2	.680	.070	90	.719	.090	88
1.6	.693	.035	95	.660	.040	94

本発明は限定ではなく例示として説明されてきたが、種々の変更及び修正がなされうことは理解されるであろう。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、ヘモグロビン突然変異に特異的なオリゴヌクレオチド配列の固定化の結果のオートラジオグラフを示す。

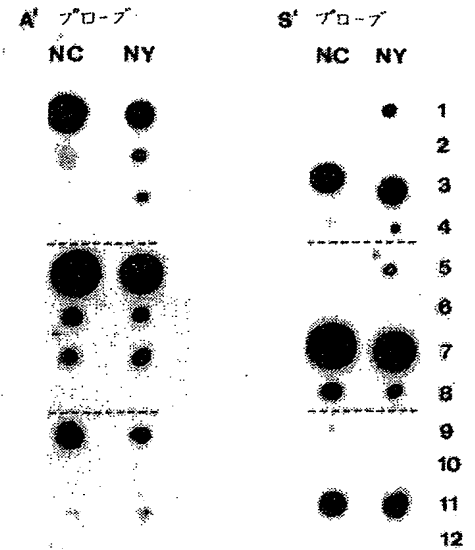
第2図は非放射性検出のためのラベルされたゲノムDNAとのハイブリダイゼーションの結果の写真である。

特許出願人 モレキュラー・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド

代理人 弁理士 小田島 平吉



第1図



第2図

